

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Biologie



**Tereza Kabičková**

Vliv nadbytku železa na indukci apoptózy u savčích buněk  
Effect of iron overload on the induction of apoptosis in mammalian cells

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Kamila Balušíková

Praha, 2011

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 01. 05. 2011

Tereza Kabíčková

**Poděkování:**

Děkuji své školitelce RNDr. Kamile Balušíkové za pomoc a cenné rady při psaní této bakalářské práce.

# Obsah

<b>1. Abstrakt .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>3. Seznam zkratk .....</b>	<b>3</b>
3.1. Seznam zkratk proteinů.....	3
<b>4. Úvod .....</b>	<b>5</b>
<b>5. Metabolismus železa .....</b>	<b>7</b>
<b>6. Regulace metabolismu železa.....</b>	<b>8</b>
6.1. Regulace metabolismu železa na úrovni buňky.....	8
6.2. Regulace metabolismu železa na úrovni organismu.....	10
<b>7. Buněčné a orgánové poškození nadbytkem železa.....</b>	<b>12</b>
7.1. Ochrana buněk před negativním působením železa .....	12
7.1.1. Cytoplasmatický feritin.....	12
7.1.2. Mitochondriální feritin.....	13
<b>8. Apoptóza .....</b>	<b>13</b>
8.1. Vnitřní cesta aktivace apoptózy .....	14
8.2. Vnější cesta aktivace apoptózy .....	14
8.3. Úloha stresu endoplasmatického retikula v aktivaci apoptózy .....	15
8.4. Úloha lysosomů v aktivaci apoptózy .....	17
<b>9. Apoptóza indukovaná nadbytkem železa u vybraných typů buněk .....</b>	<b>18</b>
9.1. Hepatocyty .....	18
9.2. Kardiomyocyty .....	20
9.3. Pankreatické $\beta$ buňky.....	21
9.4. Indukce apoptózy u dalších typů buněk.....	22
9.4.1. Endoteliální buňky .....	22
9.4.2. Intestinální buňky .....	22
9.4.3. Nervové buňky.....	23
9.4.4. Osteoblasty.....	23
9.4.5. Mesenchymální kmenové buňky .....	24
<b>10. Závěr .....</b>	<b>25</b>
<b>11. Seznam literatury .....</b>	<b>26</b>
<b>12. Seznam obrázků .....</b>	<b>34</b>

## 1. Abstrakt

Kationty železa jsou důležité ionty kovů nezbytné pro řadu základních buněčných funkcí. Při nadbytku železa však mohou být pro organismus velmi toxické. Volné ionty železa katalyzují prostřednictvím Fentonovy reakce vznik vysoce reaktivních kyslíkových (především hydroxylových) radikálů. Homeostáza železa v organismu je regulována pomocí striktního mechanismu a to především na úrovni příjmu železa enterocyty. Absorpce, transport a skladování železa v rámci organismu jsou dále regulovány pomocí mechanismů lišících se na úrovni buňky a na úrovni celého organismu. Narušení přísné homeostázy železa vede k jeho akumulaci v buňce a ke vzniku reaktivních kyslíkových radikálů. Reaktivní částice mohou způsobovat vážné buněčné poškození až apoptózu. Skladování přebytečného železa v organismu a následný vznik oxidativního stresu tak může ovlivňovat celou řadu tkání. Orgánová poškození, jako je fibróza, cirhóza, hepatocelulární karcinom, srdeční selhání, ztráta  $\beta$  buněk a nízká glukózová tolerance či diabetes mellitus, jsou u nemocných s přetížením železem velmi často pozorována. Nicméně proces indukce apoptózy v důsledku přetížení buněk nadměrným příjmem železa není dosud dobře prozkoumán. Stále neexistují žádné komplexní informace o tom, jak oxidativní stres ovlivňuje různé typy buněk, či zdali se indukce apoptózy účastní i další zatím neidentifikované faktory. Důkladnější znalost mechanismů vedoucích k apoptóze buněk v důsledku nadbytku železa může být při léčbě onemocnění spojených s poškozením orgánů vysokými hladinami železa velmi užitečná.

**Klíčová slova:** apoptóza, hepatocyty, kardiomyocyty, metabolismus železa, nadbytek železa, oxidativní stres, reaktivní kyslíkové radikály

## 2. Abstract

Iron cations are an important metal ions required to number of essential cell functions. On the other hand, ferrous iron can be very toxic as well. When surplus iron is present in cells, it can catalyze the formation of reactive oxygen species (especially hydroxyl radicals) by Fenton reaction. Iron homeostasis is predominantly regulated by very strict mechanisms on the level of iron uptake into the body. Moreover, iron absorption, transport and storage within the body can be also regulated using complex mechanisms which differ on the level of individual cells and on the level of whole organism. Deregulation of iron homeostasis causing an iron overload and generation of reactive oxygen radicals can evoke serious cell damage leading up to apoptotic cell death. Excess iron storage and subsequent development of oxidative stress can affect lot of different tissues in the body. The organ damages such as fibrosis, cirrhosis, hepatocellular carcinoma, heart failure, loss of  $\beta$  cells and glucose intolerance or diabetes mellitus in patients with iron overload are very often seen. Nevertheless, the apoptosis induced by iron overload has not been well elucidated yet. There are no complex informations about the precise mechanism by which oxidative stress affects different cell types or whether there are other unknown factors involved in apoptosis induction. Thus, the better understanding of apoptosis causation due to the body iron overload may be useful in the treatment of diseases associated with iron organ damage.

**Key words:** apoptosis, cardiomyocytes, hepatocytes, iron metabolism, iron overload, oxidative stress, reactive oxygen species

### 3. Seznam zkratk

ALD	alkoholové jaterní poškození („alcoholic liver disease“)
(d)ATP	(deoxy)adenosin trifosfát („(deoxy)adenosin triphosphate“)
DNA	deoxyribonukleová kyselina („deoxyribonucleic acid“)
ER	endoplasmatické retikulum
HAMP	„hepcidin antimicrobial peptide“
HRE	„hypoxia-response element“
IRE	„iron-response element“
MPT	„mitochondrial permeability transition“
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina („messenger ribonucleic acid“)
NASH	nealkoholová steatohepatitida („nonalcoholic steatohepatitis“)
PTP	“permeability transition pore”
ROS	reaktivní kyslíkové radikály („reactive oxygen species“)
UTR	nepřekládaná oblast („untranslated region“)

#### 3.1. Seznam zkratk proteinů

ACO1	akonitáza 1 („aconitase 1“)
AIF	„apoptosis inducing factor“
ANT	„adenin nucleotide translocator“
Apaf-1	„apoptotic protease activating factor 1“
Bak	„Bcl-2 homologous killer“
Bax	„Bcl-2 associated X protein“
Bcl-2	„B-cell lymphoma 2“
Bcl-x <sub>L</sub>	„B-cell lymphoma-extra large“
c-FLIP	„cellular FLICE inhibitory protein“
CREBH	„cyclic AMP response element-binding protein H“
Dcytb	duodenální cytochrom b („duodenal cytochrome b“)
DISC	„death-inducing signaling complex”
DMT1	„divalent metal transporter-1“
FADD	„Fas-associated death domain“
FLICE	„FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme”
HCP1	„heme carrier protein 1“

HFE	„high-Fe“
HIF	„hypoxia-inducible factor“
HO1	„heme oxygenase 1“
HtrA2	„high temperature requirement A2 peptidase“
IREB2	„iron response element binding protein 2“
IRP	„iron-responsive protein“
Smac/DIABLO	„second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI“
(t)BID	„(truncated) Bcl-2 interacting domain 3 death agonist“
TfR1	transferrinový receptor 1 („transferrin receptor 1“)
TfR2	transferrinový receptor 2 („transferrin receptor 2“)
VDAC	„voltage-dependent anion channel“



## 4. Úvod

Železo je i přes stopové množství v organismu pro buňky esenciální. V organismu se účastní mnoha biochemických procesů včetně transportu kyslíku, buněčné respirace, citrátového cyklu, metabolismu lipidů, regulace genové exprese či syntézy DNA. Je také přítomno v hemové skupině hemoglobinu, myoglobinu, cytochromů a v nehemové podobě v ribonukleotidreduktáze či jako [Fe-S] proteiny.

Dostatečné množství železa je nezbytné pro veškeré tkáně a buňky, aby byl zajištěn jejich správný růst a přežívání. Protože organismus nemá schopnost železo aktivně vylučovat, regulace homeostázy železa v organismu probíhá především na úrovni příjmu železa enterocyty. Je-li homeostáza železa narušena, může snadno docházet k jeho nedostatku nebo akumulaci především v buňkách parenchymatických tkání. Jak nedostatek, tak i nadbytek železa v jednotlivých buňkách může vést k jejich poškození až apoptóze s následným vážným orgánovým poškozením.

Nadbytek železa je pro buňky škodlivý vzhledem ke schopnosti železa produkovat reaktivní kyslíkové radikály (ROS), které poškozují DNA a buněčné membrány. Oxidativní stres způsobený nadbytkem železa a pravděpodobně i snížené hladiny antioxidačních enzymů mohou iniciovat apoptózu buněk orgánů, ve kterých je nadbytečné železo akumulováno. Následně, dle rozsahu poškození a v závislosti na orgánu, dochází k různým patologickým stavům. Akumulace železa vede postupně nejen k buněčné smrti a orgánovým dysfunkcím, ale i četným fibrózám a případně až ke karcinogenezi.

Orgány nejvíce poškozované akumulací železa a následným oxidativním stresem jsou především játra, pankreas a srdce. Dále pak nadbytek železa negativně ovlivňuje buňky endotelu, makrofágy a buňky nervové tkáně. Akumulace nadbytečného železa může být tudíž příčinou různých onemocnění jako např. hemochromatózy, nealkoholové steatohepatitidy, alkoholového poškození jater, srdečních dysfunkcí či diabetes mellitus u pacientů s hemochromatózou. Významný negativní vliv nadbytku železa je však známý i při opakovaných transfúzích.

Porozumění molekulárním mechanismům akumulace železa v buňkách a procesům indukujícím následné tkáňové poškození má z hlediska prevence a léčby uvedených onemocnění značný klinický význam.

Cílem práce je shrnout dosavadní poznatky o vlivu nadbytku železa na indukci apoptózy, která může být příčinou buněčných a orgánových poškození.

Práce shrnuje současné znalosti především o vlivu železa na produkci reaktivních kyslíkových radikálů a vznik oxidativního stresu, který vede k poškození buněčných organel a indukci apoptózy. Následkem apoptotického působení vysokých hladin železa v buňkách může docházet k dysfunkci zejména parenchymatických orgánů a k jejich případnému selhání.

## 5. Metabolismus železa

Absorpce železa do organismu probíhá na apikální straně duodenálních enterocytů pomocí molekuly DMT1 („divalent metal transporter 1“). DMT1 transportuje kromě dvojmocného železa i jiné dvojmocné ionty kovů, jako je zinek, mangan, kobalt, kadmium, měď, nikl a olovo (Gunshin et al., 1997). Protože se přijímané železo v trávicím traktu vyskytuje především ve formě trojmocné, musí být před transportem do buňky pomocí DMT1 nejprve redukováno. K redukci iontů  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$  dochází pomocí ferireduktázy Dcytb („duodenal cytochrome b“) nacházející se v kartáčovém lemu enterocytů (McKie et al., 2001). Je však pravděpodobné, že zde existují i jiné, dosud nespecifikované mechanismy podílející se na redukci železa (Gunshin et al., 2005).

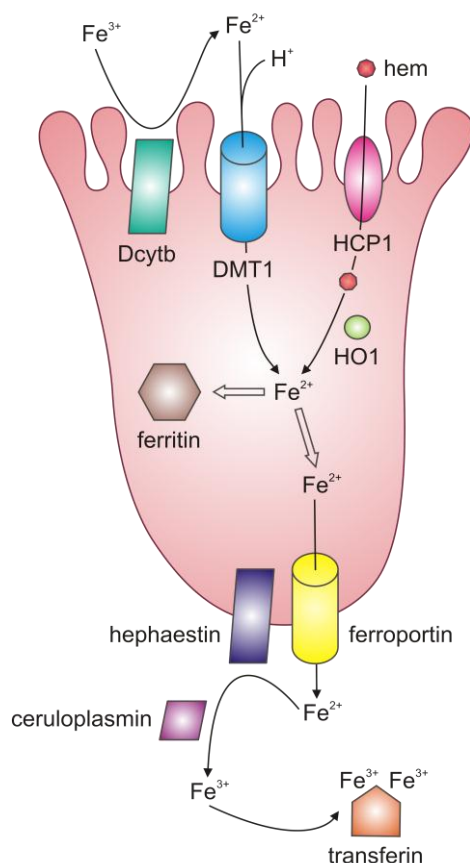
V buňkách může být železo uskladněno navázané na feritin nebo transportováno do cirkulace pomocí molekuly feroportinu. Feroportin, lokalizovaný na basolaterální membráně enterocytů, je doposud jediný známý exportér železa z buněk do krevního oběhu. Dále zajišťuje transport železa i z hepatocytů a makrofágů, které hrají důležitou roli při recirkularizaci železa v organismu (Donovan et al., 2000). Exportované železo je v krevním řečišti opětovně oxidováno buď pomocí membránové oxidázy hefestinu (Vulpe et al., 1999) nebo plasmatické oxidázy ceruloplasminu, která je přednostně používána makrofágy a hepatocyty (Harris et al., 1999)<sup>1</sup>.

Trojmocné železo uvolněné do cirkulace je vázáno na molekulu transferinu, která má dvě vysokoafinitní vazebná místa pro železité ionty. Za normálních podmínek transferin obsahuje většinu plasmatického železa a je tedy hlavním zdrojem železa pro většinu tkání. Transferin s navázaným železem (holotransferin) se váže na specifické membránové receptory TfR1 („transferrin receptor 1“). Internalizace komplexu transferin/TfR1 probíhá pomocí receptorem zprostředkované endocytózy. K následnému uvolnění železa v buňce dochází v kyselém pH endosomu (Donovan et al., 2006). Aby mohlo být volné železo transportováno z endosomu do cytosolu (opět prostřednictvím DMT1), musí být nejprve redukováno pomocí membránové ferireduktázy Steap 3 nacházející se na endosomální membráně (Ohgami et al., 2005). Redukované železo je pak dále transportováno do cytosolu, zatímco komplex transferinu bez navázaného železa (apotransferin) s receptorem TfR1 se vrací zpět na membránu, kde transferin od TfR1 disociuje (Donovan et al., 2006).

---

<sup>1</sup> Transport netransferinového železa u enterocytu je schematicky znázorněn v Obr. 1.

K TfR1 je homologní TfR2 („transferrin receptor 2“), který se exprimuje převážně v hepatocytech, buňkách krypt duodena a erytroidních buňkách. Váže transferin s přibližně třicetkrát nižší afinitou než TfR1 a podílí se především na regulaci metabolismu železa (Hentze et al., 2004).



Obr. 1 Mechanismus transportu netransferinového železa u enterocytu (převzato z Horák et al., 2010).

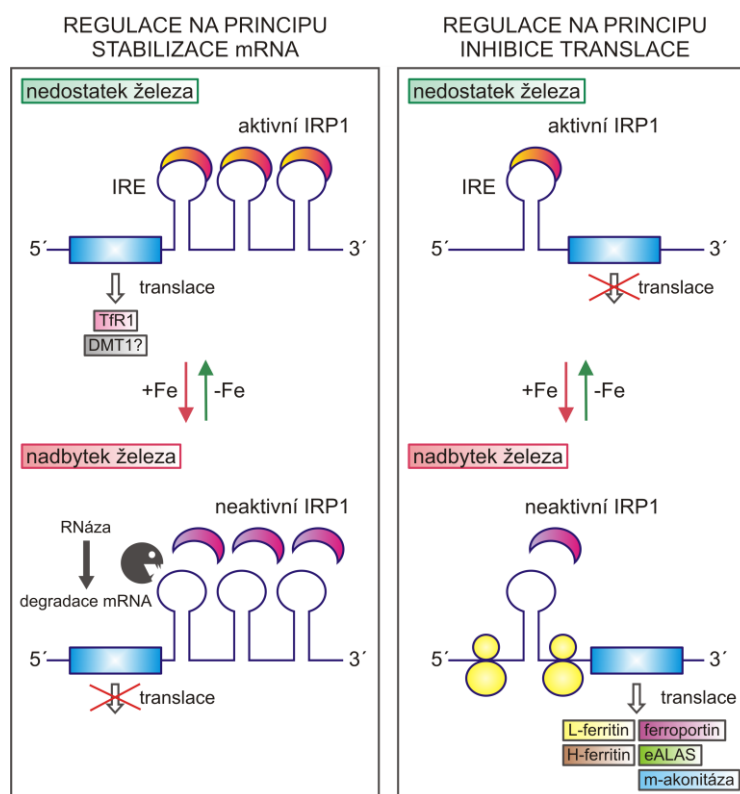
## 6. Regulace metabolismu železa

Regulace metabolismu železa probíhá jednak na úrovni buňky pomocí systému „iron regulatory protein/iron responsive element“ (IRP/IRE) a jednak na úrovni organismu, kde má klíčový význam peptid hepcidin.

### 6.1. Regulace metabolismu železa na úrovni buňky

IRP/IRE regulační systém se účastní posttranskripční kontroly genové exprese v závislosti na množství železa v buňce. IRE oblasti nalezené v mRNA genů kódujících molekuly metabolismu železa jsou vlásenkovité struktury nacházející se

v nepřekládaných oblastech UTR („untranslated region“) dané mRNA molekuly. Na tyto vlásenky se váží dva typy regulačních molekul IRP1 a IRP2. Tím ovlivňují stabilitu molekuly mRNA a regulují translaci. K IRP/IRE interakci dochází v buňkách v důsledku nedostatku železa, kdy se IRP váže na IRE s vysokou afinitou. IRE oblasti byly nalezeny např. v mRNA molekulách feritinu, feroportinu, TfR1 a DMT1. V případě IRE oblasti nacházející se v 3'-UTR mRNA molekuly (TfR1, DMT1) dochází při nedostatku železa v buňce k vazbě IRP na IRE oblast a translaci dané mRNA (Koeller et al., 1989; Gunshin et al., 1997). Za podmínek nedostatku železa se IRP váže na IRE oblast přítomnou v 5'-UTR mRNA molekuly (feritin, feroportin) a dochází k inhibici translace mRNA daného genu (Hentze et al., 1987; McKie et al., 2000)<sup>2</sup>. Nepřiměřeně vysoká aktivita IRP v monocytech, makrofázích a buňkách duodena pak vede k tomu, že tyto buňky, klíčové pro transport železa, jsou železo deficientní (Recalcati et al., 2006).



Obr. 2 Regulace metabolismu železa prostřednictvím IRP/IRE interakcí (převzato z Horák et al., 2010).

<sup>2</sup> Regulace metabolismu železa prostřednictvím systému IRP/IRE je schématicky znázorněna v Obr. 2.

IRP1 (ACO1, „aconitase 1“) je cytosolickou součástí mitochondriální akonitázy. V buňkách nasycených železem se nachází v aktivní formě, ale za podmínek nedostatku železa ztrácí akonitázovou aktivitu a váže se na IRE (Cairo and Recalcati, 2007).

IRP2 (IREB, „iron-responsive element-binding protein“) je homologní k IRP1, ale postrádá akonitázovou aktivitu (Cairo and Recalcati, 2007). IRP2 je u člověka hlavní regulační molekulou intracelulární homeostázy železa. Má sice nižší vazebnou aktivitu než IRP1, ale exprimuje se více (Recalcati et al., 2006). IRP2 se hromadí v buňkách, které mají železa nedostatek, a je naopak cíleně degradován v proteasomech buněk, které mají železa dostatek (Iwai et al., 1998).

## **6.2. Regulace metabolismu železa na úrovni organismu**

Regulace homeostázy železa na úrovni organismu probíhá již při příjmu železa enterocyty, ale zahrnuje i recyklaci železa z makrofágů a uvolňování železa z hepatocytů.

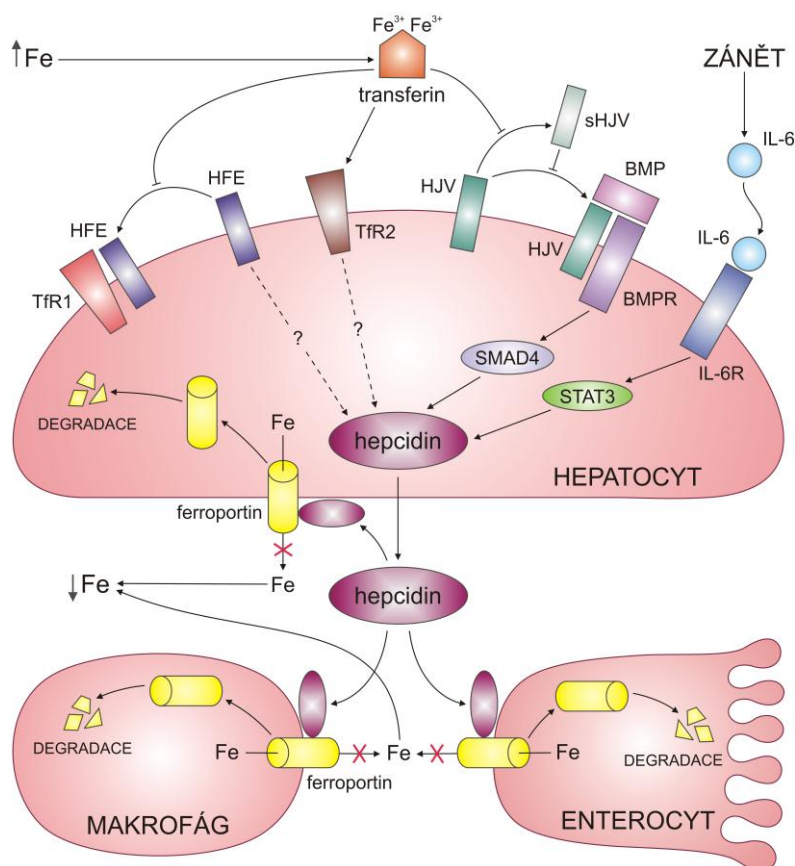
Za hlavní regulační molekulu účastnící se homeostázy železa na úrovni organismu je považován peptid hepcidin. Je to malý peptid s antimikrobiálním účinkem bohatý na cystein produkovaný především hepatocyty (Park et al., 2001). Produkce hepcidinu však byla potvrzena i v srdci (Merle et al., 2007), pankreatu (Kulaksiz et al., 2008), ledvinách (Kulaksiz et al., 2005) a tukové tkáni (Bekri et al., 2006).

Při vyšších hladinách železa v organismu se zvyšuje i exprese hepcidinu (Pigeon et al., 2001). Aktivní hepcidin se váže na ferroportin a způsobuje jeho internalizaci a degradaci v lysosomu a snižuje tak absorpci železa enterocyty při jeho nadbytku v organismu (Nemeth et al., 2004). Hepcidin, prostřednictvím negativní zpětné vazby, inhibuje nejen expresi ferroportinu, ale i dalších molekul (DMT1, Dcytb) účastnících se transportu železa (Wang et al., 2005). Na druhou stranu, inaktivace hepcidinu způsobuje nadbytek železa v organismu a jeho akumulaci v různých tkáních včetně jater, pankreatu a srdce (Nicolas et al., 2001).

Expresce hepcidinu je ovlivňována především membránovými proteiny HFE („high-Fe“), TfR2 a hemojuvelinem. Mutace v genech kódujících tyto proteiny včetně samotného genu pro hepcidin (HAMP) vedou ke snížené expresi hepcidinu a následně k přetížení železem (Donovan et al., 2006). Jiná možnost regulace exprese hepcidinu nastává např. při zánětu či hypoxii. Interleukin-6 a pravděpodobně i jiné prozánětlivé cytokiny indukují expresi genu pro hepcidin v hepatocytech (Nemeth et al., 2004),

zatímco hypoxie prostřednictvím systému HIF/HRE (hypoxia-inducible factor/hypoxia-response element) expresi hepcidinu snižuje (Peyssonnaud et al., 2007)<sup>3</sup>.

Lidský hepcidinový promotor obsahuje navíc „p53-response element“ oblast, do které se *in vivo* váže protein p53 a aktivuje transkripci hepcidinu. Snížení množství dostupného železa zprostředkované zvýšením exprese hepcidinu může být novou dráhou, kterou protein p53 působí deprivaci železa v rakovinových buňkách, vedoucí k zastavení buněčného růstu a apoptóze. Je ale možné, že v maligních buňkách, které mají protein p53 mutovaný, dochází k přerušení této indukční dráhy a tím k následnému snížení exprese HAMP genu. To by mělo za následek zvýšenou dostupnost železa a proliferaci maligních buněk (Weizer-Stern et al., 2007).



**Obr. 3 Regulace metabolismu železa prostřednictvím hepcidinu (převzato z Horák et al., 2010).**

<sup>3</sup> Regulaci metabolismu železa prostřednictvím hepcidinu shrnuje Obr. 3.

## **7. Buněčné a orgánové poškození nadbytkem železa**

Akumulace nadbytečného železa v převážně parenchymatických orgánech, například v játrech, pankreatu, srdci a v endokrinním systému, vede k dysfunkci těchto orgánů způsobené produkcí ROS (Kohgo et al., 2008). Volné dvojmocné ionty železa produkuje ROS prostřednictvím Fentonovy reakce, při které katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku především za vzniku extrémně reaktivních hydroxylových radikálů (Liochev and Fridovich, 1994). Hydroxylové radikály, ale i další ROS, jsou schopné reagovat s mnoha buněčnými součástmi včetně zbytků aminokyselin, karbohydrátů a bazí DNA či atakovat membránové lipidy a způsobovat jejich peroxidaci. Na druhou stranu, ROS jsou v buňce produkovány i během normálního buněčného metabolismu a buňka má proti jejich toxickému působení řadu cytoprotektivních enzymů a antioxidantů. V případě zvýšeného množství volného železa v buňce však dochází i ke zvýšené produkci ROS a následnému buněčnému poškození (Crichton et al., 2002).

### **7.1. Ochrana buněk před negativním působením železa**

Dvojmocné ionty železa se hojně účastní biologických reakcí, ale pokud jeho množství přesáhne protektivní kapacitu feritinu, stává se díky produkci ROS cytotoxickým a karcinogenním. Způsobuje orgánové dysfunkce včetně buněčné smrti, poškození tkáně a fibrózy (Kohgo et al., 2008).

Buňky však mají vyvinuty i mechanismy, které poškození nadměrným množstvím železa předcházejí. Jedním z těchto mechanismů je zvýšená syntéza feritinu.

#### **7.1.1. Cytoplasmatický feritin**

Za podmínek oxidativního stresu dochází ke zvýšené syntéze H a L podjednotky feritinu. H podjednotka feritinu se účastní oxidace železa a L podjednotka je odpovědná za uskladnění železa a stabilitu proteinu (Harrison and Arosio, 1996).

Přechodně zvýšená aktivita IRP proteinů u buněk vystavených oxidativnímu stresu umožňuje zvýšit expresi feritinu a snížit tak akumulované ROS díky vychytávání intracelulárního železa právě feritinem (Orino et al., 2001). Na druhou stranu bylo prokázáno, že oxidanty, jako např. superoxidový radikál, jsou schopny železo z feritinu uvolňovat (Harris et al., 1994).



Syntéza antioxidantních enzymů je další možnou obranou proti oxidativnímu stresu, ale poskytuje před ním pravděpodobně jen malou ochranu. V závislosti na koncentraci železa může naopak docházet ke snížení hladiny přítomných antioxidantů v jaterní tkáni a díky tomu ke zvýšení oxidativního stresu indukovaného nadbytkem železa (Allameh et al., 2008).

### **7.1.2. Mitochondriální feritin**

Expresí mitochondriálního feritinu není ovlivňována množstvím železa. Mitochondriální feritin, který reguluje dostupnost železa pro mitochondrie, chrání buňky s vysokou oxidativní aktivitou (Campanella et al., 2009). Zvýšená exprese mitochondriálního feritinu způsobuje nedostatek železa v cytoplasmě a koreluje jak s inhibicí syntézy cytoplasmatického feritinu, tak i se zvýšenou expresí TfR jako odpovědí buňky na nedostatek železa (Nie et al., 2005). Nově získané železo z transferinu, ale i z redistribuce intracelulárního železa, převážně z degradace feritinu, je pravděpodobně zodpovědné za zvýšenou senzitivitu k oxidativnímu stresu u buněk, které mitochondriální feritin exprimují (Lu et al., 2009).

## **8. Apoptóza**

Podněty vedoucí k apoptóze mohou být fyziologické, jako je UV světlo, ozáření či infekce nebo stresového původu, např. ROS, nadbytek  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a proteinu Bax. Nicméně všechny klíčové události související s apoptózou jsou spojeny s poškozením mitochondrií (Gulbins et al., 2003).

Dlouhodobé vystavení buněk a orgánů nadbytku železa vede k interakcím mezi železem a mitochondriálními ROS. Výsledkem je kumulativní poškození mitochondriální DNA, narušená syntéza podjednotek respiračního řetězce a respirační dysfunkce. Je možné, že mitochondrie mající poškozený genom produkují daleko větší množství volných radikálů, které poškození orgánů urychlují (Gao et al., 2009).

Vzhledem k mechanismu vedoucímu k poškození mitochondriálních funkcí můžeme proces aktivace apoptózy rozdělit na vnitřní a vnější cestu. Vnitřní cesta začíná zhroucením mitochondriálního membránového potenciálu, vnější cesta je indukovaná receptory smrti.

## 8.1. Vnitřní cesta aktivace apoptózy

Mechanismy zprostředkovávající uvolnění pro-apoptotických signálů z mitochondrií nejsou přesně známy. Bylo však prokázáno, že hlavní roli má transmembránový kanál PTP („permeability transition pore“). PTP se skládá z proteinu VDAC („voltage-dependent anion channel“) ve vnější mitochondriální membráně a proteinu ANT („adenin nucleotide translocator“) ve vnitřní membráně. Po indukci apoptózy interagují určité proteiny, např. Bax („Bcl-2 associated X protein“) a Bak („Bcl-2 homologous killer“), s PTP (Oltvai et al., 1993; Chittenden et al., 1995). Aktivace PTP má tedy za následek permeabilizaci vnější i vnitřní mitochondriální membrány (Zamzani and Kroemer, 2001) a slouží k uvolnění cytochromu c (Liu et al., 1996) a ostatních proapoptotických proteinů do cytoplasmy (Narita et al., 1998; Shimizu et al., 1999). Na druhé straně, antiapoptotické proteiny, např. Bcl-2 („B-cell lymphoma 2“) a Bcl-x<sub>L</sub> („B-cell lymphoma-extra large“) (Bissonnette et al., 1992; Boise et al., 1993), brání vytvoření tohoto póru a zabraňují apoptóze (Narita et al., 1998; Shimizu et al., 1999).

Další pro-apoptotické proteiny, které jsou následkem zvýšení permeability mitochondriální membrány uvolněny do cytoplasmy, jsou kaspáza-9 (Susin et al., 1999a), protein Smac/DIABLO („second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI“) (Du et al., 2000), AIF („apoptosis inducing factor“) (Susin et al., 1999b), HtrA2 („high temperature requirement A2 peptidase“) (Suzuki et al., 2001) a endonukleáza G (Li et al., 2001).

Uvolněný cytosolický cytochrom c následně iniciuje tvorbu proteinového komplexu apoptosomu (Obr. 4) skládajícího se z cytochromu c a proteinu Apaf-1 („apoptotic protease activating factor 1“) za přítomnosti dATP/ATP (Acehan et al., 2002). Apoptosom váže a aktivuje kaspázu-9, která aktivuje kaspázu-3, jež spouští exekuční fázi apoptózy (Gulbins et al., 2003)<sup>4</sup>.

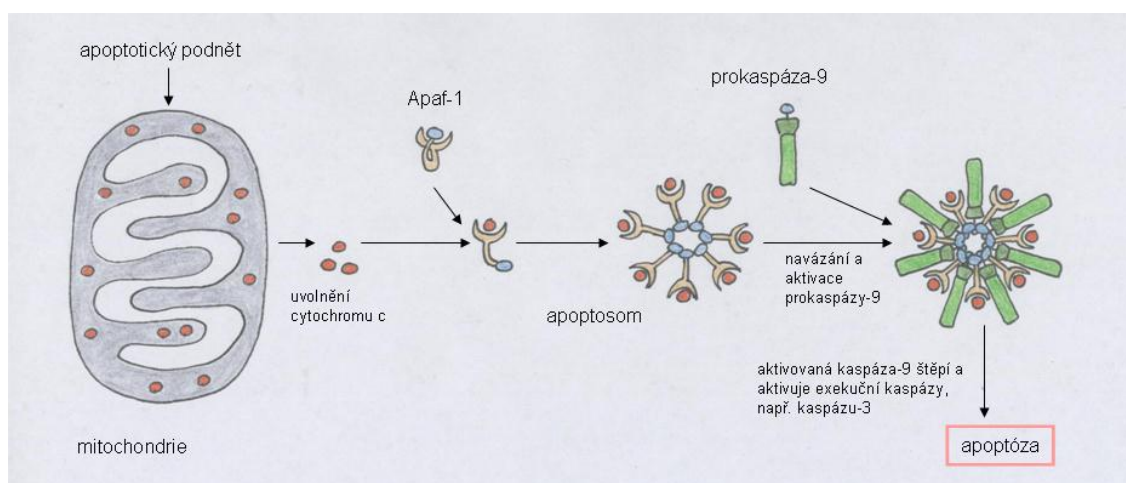
## 8.2. Vnější cesta aktivace apoptózy

Fas receptor (CD95) po navázání ligandu spouští apoptózu translokací kyselé sfingomyelinázy z intracelulárního prostoru na povrch plasmatické membrány. Kyselá sfingomyelináza katalyzuje tvorbu ceramidu na plasmatické membráně. Ceramid zde vytváří membránové komplexy, které zprostředkovávají shlukování Fas receptorů, které

---

<sup>4</sup> Vnitřní cesta aktivace apoptózy je schématicky znázorněna v Obr. 5.

je nezbytné pro signalizaci (Grassmé et al., 2001).



**Obr. 4** Schéma tvorby apoptosomu (upraveno dle Alberts et al., 2008).

Převod signálu z aktivovaných a oligomerizovaných Fas receptorů začíná tvorbou signalizačního komplexu DISC („death-inducing signaling komplex“) (Kischkel et al., 1995). DISC se skládá z receptorů smrti, např. Fas receptorů, adaptorového proteinu FADD („Fas-associated death domain“), prokaspázy-8 (FLICE, „FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme“), prokaspázy-10 a proteinů c-FLIP („cellular FLICE inhibitory proteins“) (Lavrik, 2011). Protein FADD váže a aktivuje prokaspázu-8 (Muzio et al., 1996). Aktivovaná kaspáza-8 aktivuje signální dráhu zahrnující například aktivaci kaspázy-3, která vede k apoptóze (Green and Kroemer, 1998).

Kaspáza-8 dále štěpí protein BID („Bcl-2 interacting domain 3 death agonist“), který je poté translokován z cytoplazmy na vnější membránu mitochondrie. Naštěpený protein BID (tBID, „truncated BID“) indukuje shlukování mitochondrií okolo jádra, uvolnění cytochromu c z mitochondrií, ztrátu mitochondriálního membránového potenciálu, smrštění buňky a kondenzaci jádra (Li et al., 1998)<sup>5</sup>.

### 8.3. Úloha stresu endoplasmatického retikula v aktivaci apoptózy

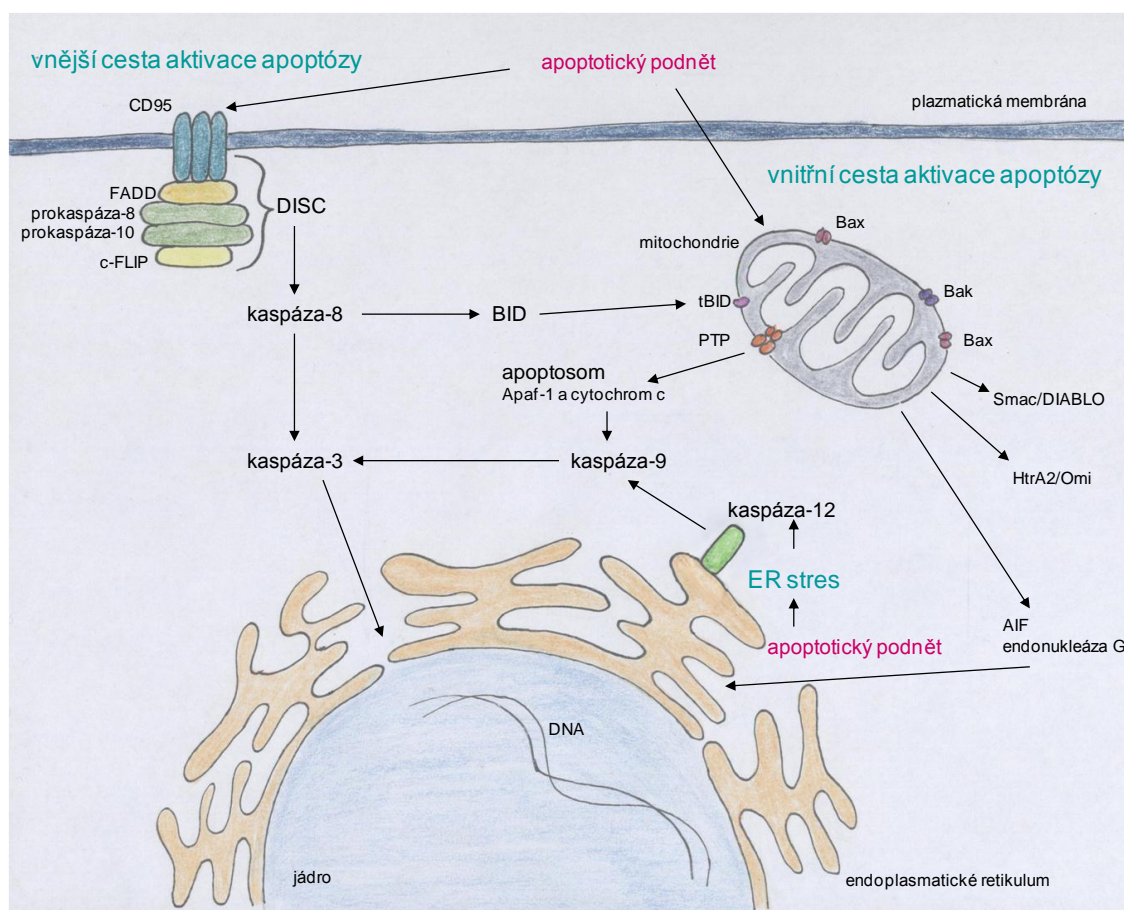
Role stresu endoplasmatického retikula (ER stres) v patogenezi buněčného poškození indukovaného nadbytkem železa není příliš prozkoumaná. ER stres by mohl být odpovědí na oxidativní stres způsobený nadbytkem železa a mohl by způsobovat

<sup>5</sup> Vnější cesta aktivace apoptózy je schématicky znázorněna v Obr. 5

poškození buněk jater a srdce (Lou et al., 2009). Nadbytek železa vyvolávající oxidativní stres zde může nastat při inhibici exprese hepcidinu. CREBH („cyclic AMP response element-binding protein H“), transkripční faktor indukovaný přímo ER stresem, se váže a inaktivuje hepcidinový promotor, což snižuje syntézu aktivního hepcidinu v buňkách (Vecchi et al., 2009).

ER stres aktivuje kaspázu-12 nacházející se na cytoplasmatické straně membrány endoplasmatického retikula (Nakagawa et al., 2000). Cytosolická kaspáza-7 se vlivem ER stresu translokuje na povrch endoplasmatického retikula a aktivuje kaspázu-12. ER stres dále napomáhá transportu kaspázy-12 do cytoplasmy, kde interaguje s kaspázou-9 (Rao et al., 2001). Zdá se, že ER stresem aktivovaná kaspáza-12 je nezbytná pro indukci apoptózy (Nakagawa et al., 2000) v důsledku nadbytku železa (Lou et al., 2009).

Regulace hepcidinu pomocí ER stresu spojuje intracelulární odpovědi zahrnující kontrolu kvality proteinů a homeostázu železa (Vecchi et al., 2009)<sup>6</sup>.



**Obr. 5 Schéma aktivace apoptózy vnější cestou, vnitřní cestou a ER stresem.**

<sup>6</sup> Aktivace apoptózy ER stresem je schématicky znázorněna v Obr. 5

## 8.4. Úloha lysosomů v aktivaci apoptózy

Lysosomální membrány jsou vystavené redoxně aktivnímu železu uloženému ve velkém množství právě v lysosomech a jsou tedy primárním cílem oxidativního poškození. Nízkomolekulární železo katalyzuje peroxidaci lysosomální membrány vedoucí k její permeabilizaci. Narušení lysosomální membrány je možnou primární příčinou oxidativního poškození buňky a buněčné smrti. K permeabilizaci mitochondriální membrány dochází sekundárně v důsledku uvolnění redoxně aktivního železa a hydrolytických enzymů do cytoplasmy po prasknutí lysosomu. V závislosti na rozsahu poškození buňka provede buď reparační autofagii nebo dojde k apoptóze či nekróze (Kurz et al., 2006; Ghosh et al., 2011). Vzhledem k uvedeným skutečnostem mohou být chelátory železa, cíleně mířené do lysosomu, užitečné při snižování oxidativního poškození buněk (Kurz et al., 2006).

Množství redoxně aktivního železa v lysosomech se liší mezi různými buňkami i jednotlivými lysosomy. Pravděpodobně záleží na předcházejícím zapojení jednotlivých lysosomů do degradace materiálu obsahujícího železo (Nilsson et al., 1997). Lysosomální protržení indukované oxidativním stresem je spojeno s uvolněním katepsinů a aktivací fosfolipázy A2. Fosfolipáza A2 zvyšuje produkci ROS mitochondriemi a mění mitochondriální membránový potenciál. Následně dochází k prasknutí membrány mitochondrií, k uvolnění cytochromu c a dalším projevům apoptózy (Zhao et al., 2003).

Buňka se poškození nadměrným množstvím železa brání např. zvýšenou syntézou feritinu (viz kapitola 7.1.1.). Feritin v lysosomech však může spíše než jako ochrana sloužit jako molekula přidávající lysosomům další železo. Činí je tak citlivějšími k oxidativnímu stresu (Kurz et al., 2007) a případně zprostředkovává poškození tkání (Terman et al., 2008). Endocytóza extracelulárního feritinu zvyšuje v lysosomech množství volných  $\text{Fe}^{2+}$  iontů, které Fentonovou reakcí produkují volné radikály. ROS se účastní lipidové peroxidace, která je příčinou zvýšení permeability lysosomální membrány. Následné uvolnění lysosomálních enzymů vede k modifikaci proteinů a DNA a k poškození buňky. Tyto efekty spouští apoptózu a nekrózu založenou na zvýšené expresi p53, vyšší permeabilitě mitochondriální membrány a proapoptotické Fas signalizaci (Bresgen et al., 2010).

## 9. Apoptóza indukovaná nadbytkem železa u vybraných typů buněk

### 9.1. Hepatocyty

Játra, vzhledem k jejich vysoké vazebné kapacitě, jsou hlavním orgánem uchovávajícím železo. Jsou tudíž orgánem poškozovaným nadměrnou akumulací železa nejvíce.

Zvýšený příjem železa do hepatocytů způsobuje nadbytek volného železa v cytoplazmě i v mitochondriích kultivovaných buněk. Volné železo indukuje produkci ROS a následně silné jaterní poškození se znaky odpovídajícími převážně apoptóze a v menší míře i nekróze (Rauen et al., 2004). U *in vitro* jaterních buněk ovlivněných železem dochází k navýšení exprese kaspázy-3 a apoptóze indukované nadbytkem železa v závislosti na jeho koncentračním gradientu (Yang M. et al., 2008). Železem indukovaný oxidativní stres aktivuje kromě hepatocytů i buňky produkující extracelulární matrix. Jsou to jaterní hvězdíkovité buňky, fibroblasty nebo Kupfferovy buňky účastnící se fibrogenyze (Pietrangelo, 2003).

Železem katalyzovaná tvorba hydroxylových radikálů a jiných ROS může poškozovat mitochondriální proteiny nebo indukovat mitochondriální membránovou peroxidaci. Výsledkem je poškození vnitřní mitochondriální membrány a vytvoření póru MPT („mitochondrial permeability transition“) (Rauen et al., 2004). Vytvoření MPT je příležitostný jev vedoucí k narušení rovnovážného stavu mezi úbytkem a tvorbou ATP a následně k apoptóze či nekróze. U hepatocytů vystavených stresovým faktorům, jako je právě oxidativní stres či toxickému působení  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, rozhoduje množství ATP o tom, jakou formou zánik buňky proběhne, zda apoptózou nebo nekrózou. Zatímco smrt buňky nekrózou je důsledkem úplné deplece ATP, v případě apoptózy je naopak ATP potřebné (Kim et al., 2003).

Na potkaním modelu bylo zjištěno, že akumulace železa v játrech spojená s tvorbou reaktivních kyslíkových radikálů a následnou apoptózou hraje zásadní roli při vzniku fulminantní hepatitidy, hepatické fibrózy a následného hepatocelulárního karcinomu (Kato et al., 1996).

Zvýšená hladina železa však nemusí být jediným faktorem podílejícím se na indukci buněčné smrti u hepatocytů. Produkce ROS v důsledku akumulace volného železa v buňkách může přispívat k rozvoji různých patologických stavů a být tak pouze

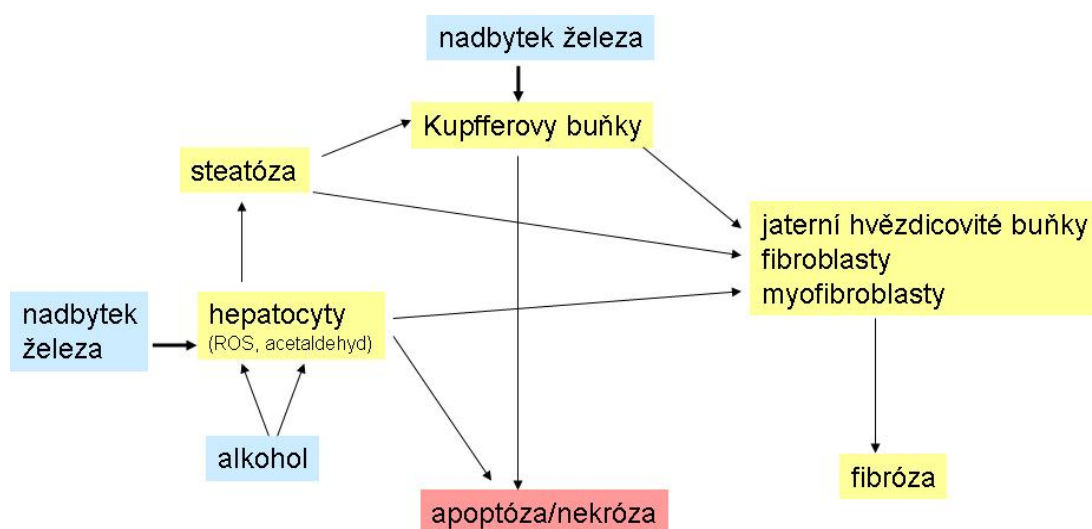
sekundární příčinou jaterního poškození. Jedná se např. o alkoholové poškození jater (ALD), nealkoholovou steatohepatitidu (NASH) či hepatitidu C, kdy přítomnost železa v hepatocytech pouze umocňuje vliv jiných faktorů (viz Obr. 6).

Alkohol navíc potlačuje ochranný efekt hepcidinu (viz kapitola 6.2.), což může mít význam pro jaterní poškození pozorované u nemocných s ALD (alcoholic liver disease) či hemochromatózou kombinovanou s alkoholem (Harrison-Findik et al., 2007). Inhibice hepcidinu zvyšuje množství reaktivního železa v hepatocytech a podporuje produkci reaktivních kyslíkových radikálů. Železem indukovaný oxidativní stres pak může umocňovat toxicitu alkoholu (Pietrangelo, 2003).

Toxické působení etanolu při ALD může být i přímé. Alkohol indukuje tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů prostřednictvím cytochromu P450 2E1, který oxiduje alkohol na acetaldehyd a následně acetát v hepatocytech a Kupfferových buňkách. Hydroxyetylové radikály jsou hlavní příčinou alkoholem indukovaného oxidativního stresu a lipidové peroxidace (Pietrangelo, 2003). Narušení homeostázy železa by tedy mohlo být jedním z mechanismů antiproliferativního efektu etanolu a exogenní železo by mohlo urychlovat etanolovou hepatotoxicitu. Při léčbě ALD mohou tak sehrát důležitou roli i chelátory železa (Tuoi Do et al., 2011). Například podávání taurinu obnovuje funkci mitochondrií, snižuje produkci ROS, zabraňuje poškození DNA a vzniku apoptózy (Devi and Anuradha, 2010).

U nemocných s hepatitidou C dochází k virem indukovanému ukládání železa do hepatocytů, což vede ke zvýšené produkci ROS, lipidové peroxidaci a apoptóze (Farinati et al., 2001). V případě virového poškození je zatížení jater různou mírou proliferace a apoptózou větší než v případě chronického příjmu alkoholu (Cardin et al., 2002).

Nadbytek železa v játrech a následný vznik hydroxylových radikálů hraje důležitou roli i v patogenezi NASH. Faktorem přispívajícím k oxidativnímu stresu by mohla být v případě pacientů s NASH inzulinová rezistence (Fujita et al., 2009). Apoptóza hepatocytů indukovaná nadbytkem železa a produkcí ROS pozitivně koreluje s jaterní fibrózou u pacientů s NASH, u kterých byla prokázána zvýšená exprese Fas receptoru (Feldstein et al., 2003). Železo zhoršuje jaterní steatózu a přispívá k rozvoji fibrózy také u potkaního modelu tohoto onemocnění v důsledku poškození tkáně větším množstvím apoptotických buněk (Imeryuz et al., 2007). Je tedy patrné, že terapie NASH založená na snížení hladiny železa v hepatocytech by mohla omezit výskyt hepatocelulárního karcinomu u nemocných (Fujita et al., 2009).



*Obr. 6 Vliv vysokých hladin železa a alkoholu na jaterní poškození (upraveno dle Pietrangelo, 2003).*

## 9.2. Kardiomyocyty

Nadbytečné železo akumulované v kardiomyocytech produkuje v hojné míře ROS a podílí se tak na srdečním poškození (Bartfay et al., 1999). Vlivem nadbytku železa však dochází i ke snížení hladin antioxidačních enzymů, jako jsou superoxiddismutáza, kataláza a glutathionperoxidáza (Bartfay and Bartfay, 2000; Turoczy et al., 2003). Zvýšená produkce ROS a snížené hladiny antioxidačních enzymů mohou být proto zodpovědné za zvýšenou citlivost organismu k poškození srdce v důsledku deregulace homeostázy železa (Turoczy et al., 2003). Pro sekundární nadbytek železa (hemosideróza) u myši jsou produkce ROS způsobená uložením nadbytečného železa v kardiomyocytech, fibróza, diastolická a systolická dysfunkce a snížená životaschopnost charakteristické (Oudit et al., 2004).

Nadbytek železa způsobuje pokles mitochondriálního membránového potenciálu (Yang J. L. et al., 2008). Tento pokles je asociován se sníženým množstvím proteinu Bcl-2 (Wang et al., 2011), následným výrazným zvýšením poměru Bax/Bcl-2 a indukcí apoptózy kardiomyocytů prostřednictvím aktivace kaspázy-9. Aktivní kaspáza-9 následně aktivuje exekuční kaspázu-3 (Arvapalli et al., 2010; Wang et al., 2011). Aktivace kaspázové signalizace hraje roli nejen při rozvoji železem indukované apoptózy, ale i fibrózy, neboť nadbytek železa zvyšuje depozici kolagenu v srdeční tkáni (Wang et al., 2011). Zhoršení srdeční funkce v případě nadbytku železa v kardiomyocytech by mohlo být způsobeno ztrátou buněk apoptózou a jejich nahrazením vazivem (Oudit et al., 2004).



Oxidativní stres dále vede k poškození mitochondriální DNA, které je spojeno se sníženou expresí mitochondriálně kódovaných mRNA a proteinů. Tyto efekty jsou asociovány se ztrátou aktivity komplexu I (nicotinamidadeninukleotid dehydrogenáza) a komplexu IV (cytochrom c oxidáza) respiračního řetězce a se sníženou mitochondriální respirací. Pravděpodobně mohou být další příčinou srdeční dysfunkce (Gao et al., 2010).

Přidatným faktorem srdečního poškození je navíc stárnutí organismu spojené s postupnou akumulací železa v srdci. Je možné, že jedním z faktorů přispívajících k uskladnění železa v kardiomyocytech je časem zvýšená exprese DMT1 a L podjednotky feritinu. Nadbytečné železo uložené v kardiomyocytech přispívá k indukci apoptózy a tím i k srdeční dysfunkci (Arvapalli et al., 2010).

Chelátory železa, např. deferasirox, jsou schopné snížit hladiny železa v kardiomyocytech a tím mohou přispívat ke snížení počtu apoptotických buněk a být tak užitečné při léčbě srdečního poškození indukovaného akumulací železa (Arvapalli et al., 2010; Wang et al., 2011). Jiným terapeutickým agens je taurin, který jako v případě hepatocytů může přispívat ke zlepšení kardiovaskulárních funkcí. Podáváním taurinu v potravě se snižuje oxidativní stres indukovaný nadbytkem železa a tím nedochází k apoptóze kardiomyocytů a následné srdeční dysfunkci (Oudit et al., 2004).

### **9.3. Pankreatické $\beta$ buňky**

Pankreatické  $\beta$  buňky se kromě regulace glukosového metabolismu účastní i regulace metabolismu železa produkcí hepcidinu (Kulaksiz et al., 2008). Selhání  $\beta$  buněk a jejich apoptóza je způsobena přímým toxickým působením železa, které se ve zvýšeném množství ukládá v Langerhansových ostrůvcích pankreatu. Nadbytek železa indukovaný například cílenou inaktivací HFE genu způsobuje oxidativní stres  $\beta$  buněk a následné snížení inzulinové sekreční kapacity, které je způsobeno apoptózou a zmenšením buněk pankreatických ostrůvků (Cooksey et al., 2004).

Na vysoké citlivosti  $\beta$  buněk k oxidativnímu stresu u lidí a zvířat při rozvoji diabetes by se mohly podílet nízké hladiny antioxidantních enzymů superoxiddismutázy, katalázy a glutathionperoxidázy (Lenzen et al., 1996). Pankreatické  $\beta$  buňky však mohou být náchylnější k oxidativnímu stresu pravděpodobně i díky jejich závislosti na mitochondriálním metabolismu glukózy pro glukózou indukovanou syntézu inzulinu (Cooksey et al., 2004).

Akumulace železa v  $\beta$  buňkách snižuje inzulinovou sekreční kapacitu a může mít primární význam při vzniku diabetu u nemocných s hemochromatózou (McClain et al., 2006; Ramey et al., 2007). Abnormální glukósová tolerance a diabetes jsou často pozorované právě u těchto nemocných a ztráta inzulinové sekreční kapacity je zde primární příčinou vedoucí k diabetes (McClain et al., 2006).

Akumulace železa v pankreatu byla demonstrována na modelu hepcidin deficientních myši. Z nejasných důvodů byly myši s hemochromatózou k železem katalyzovanému poškození  $\beta$  buněk rezistentní. Diabetes se u nich neprojevil, neboť produkce a sekrece inzulinu  $\beta$  buňkami nebyla ovlivněna. Je pak otázkou, zdali je myší model vhodný ke studiu patogeneze diabetes mellitus asociovaného s hemochromatózou (Ramey et al., 2007).

## **9.4. Indukce apoptózy u dalších typů buněk**

### **9.4.1. Endoteliální buňky**

Mechanismus či mechanismy, kterými železo indukuje cytotoxicitu endoteliálních buněk, nejsou dostatečně známy. Je však velmi pravděpodobné, že důležitou roli hraje mitochondriální dysfunkce a oxidativní stres (Carlini et al., 2006).

Bylo prokázáno, že přidavek minerálního železa endoteliálním buňkám aktivuje inhibitory cyklin-dependentních kináz p53 a p21, snižuje expresi proteinu Bcl-2, kaspázy-3 a následně způsobuje fragmentaci DNA a apoptózu (Carlini et al., 2006).

Homeostázu železa v endoteliálních buňkách regulují mitochondrie pomocí aerobního metabolismu. Buňky tudíž přijímají méně železa v důsledku snížené exprese mRNA a proteinů pro transferinový receptor, DMT1 a feritin. Nicméně množství železa uloženého v mitochondriích je zde však stejné jako u kontrolních buněk (Carraway et al., 2006).

### **9.4.2. Intestinální buňky**

Oxidativní stres a mitochondriální dysfunkce jsou obecně centrálními mechanismy vzniku různých patologických stavů. Vzhledem k tomu, že gastrointestinální trakt je konstantně vystaven oxidantům z přijaté potravy, je riziko poškození intestinálních buněk zvýšené. Na *in vitro* modelu intestinálních buněk bylo prokázáno, že železo v přítomnosti askorbátu indukuje lipidovou peroxidaci a inhibuje komplexy

mitochondriálního respiračního řetězce v důsledku jejich poškození volnými radikály, čímž dochází ke snížení produkce ATP. Volné radikály vzniklé Fentonovou reakcí dále způsobují nadbytek  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v mitochondriích, poškození mtDNA a apoptózu.

Produkci ROS v důsledku vysokých hladin železa u intestinálních buněk potvrzuje přidání silného antioxidantu, jehož působení vede ke snížení hladiny markeru oxidativního stresu (Taha et al., 2010).

#### **9.4.3. Nervové buňky**

Primární příčinou buněčné smrti nervových buněk s narušenou homeostázou železa je oxidativní poškození. Sekundárním efektem zvýšené absorpce železa jsou vytvořené agregáty feritinu s navázaným železem. Feritinové agregáty vznikají v důsledku nadměrného množství oxidovaných proteinů, které pravděpodobně proteasomy nedokáží včas degradovat. Důvodem může být inserce nukleotidů v genu pro L podjednotku feritinu přítomná u pacientů trpících neuroferitinopatiemi. Tato změna snižuje schopnost feritinu inkorporovat železo a tím dochází k narušení homeostázy železa v mozku. Nicméně takto postižené buňky vykazují sníženou proteasomální degradaci a častější buněčnou smrt především prostřednictvím nekrózy (Cozzi et al., 2010). Základní příčinou zmíněné nemoci je deregulace metabolismu železa, zatímco oxidativní stres a následná apoptóza nervových buněk jsou primární příčinou neurodegenerativního procesu. Agregáty zde pravděpodobně zvyšují toxicitu nerovnováhy metabolismu železa, neboť zvýšení hladiny železa v buňce ji činí senzitivnější k oxidativnímu poškození (Cozzi et al., 2006).

U modelových lidských neuroblastomových buněk bylo prokázáno, že citrát železitoamonný způsobuje časově a koncentračně závislou akumulaci železa, která koreluje se zvýšenou produkcí oxidantů a redoxně senzitivních signálů. Dochází k aktivaci kaspázy-3, kondenzaci chromatinu, jaderné fragmentaci a následně apoptóze (Salvador and Oteiza, 2011).

#### **9.4.4. Osteoblasty**

V buněčné linii osteoblastů, které byly inkubovány se síranem železnatým, ovlivňuje nadbytek železa expresi celé řady molekul účastnících se homeostázy železa. Akumulace železa vede např. ke snížení exprese genu pro TfR na úrovni proteinu

a zvýšení exprese L a H podjednotky proteinu feritinu. Po překročení vazebné kapacity feritinu vede nadbytek železa k potlačení buněčné diferenciaci a způsobuje apoptózu osteoblastů. Je však možné, že feritin je v osteoblastech regulován i jinými mechanismy než prostřednictvím množství intracelulárního železa (Messer et al., 2009).

#### **9.4.5. Mesenchymální kmenové buňky**

Životaschopnost lidských mesenchymálních kmenových buněk může být ovlivněna množstvím železa přidávaného do buněčné kultury v závislosti na jeho koncentračním gradientu. Nadbytek železa u těchto buněk působí navýšení exprese kaspázy-3, snížení mitochondriálního membránového potenciálu a apoptózu.

Ke zvýšení životaschopnosti mezenchymálních buněk přispělo přidání trombopoetinu, které zároveň vedlo k redukci počtu apoptotických buněk. Podobný protektivní účinek před apoptózou indukovanou nadbytkem železa byl zjištěn i po podání blokátoru kalciových kanálů (Zhang et al., 2008).

## 10. Závěr

Správně fungující regulace příjmu a výdeje železa buňkou je mechanismem, který významným způsobem ovlivňuje její vitalitu. Nadbytek železa, který může nastat z různých příčin, vede k poruše tohoto vyváženého stavu, k omezení buněčných funkcí a případně k eliminaci samotné buňky.

Pouze omezené množství studií se zabývá přímým působením nadbytku železa na indukci apoptózy, přestože je známo, že akumulace železa a následný oxidativní stres buňky poškozuje. U nevratně poškozených buněk dochází k apoptóze případně nekróze. Odumírání buněk způsobené těmito procesy vyvolává dysfunkci orgánů, která zhoršuje zdravotní stav nemocných a v některých případech se může podílet na jejich smrti.

Oxidativní stres způsobený železem a následná apoptóza poškozuje především orgány, které mají buňky s četnými mitochondriemi a vysokou respirační aktivitou. Poškození mitochondrií a dalších buněčných struktur v buňkách tak může hrát důležitou roli v indukci apoptózy. Různé typy buněk mají obdobný základní mechanismus poškození. Současné znalosti naznačují, že například ER stres způsobený nadbytkem železa by mohl hrát významnou roli v indukci apoptózy u hepatocytů a kardiomyocytů. Z výsledků experimentů prováděných na myších pankreatických  $\beta$  buňkách vyplývá, že projevy nadbytku železa mohou být ovlivněny i pokusným modelovým organismem.

Prohloubení poznatků o působení nadbytku železa na indukci apoptózy by bylo přínosné pro vývoj antiapoptotických terapií u jaterních, srdečních a dalších nemocí souvisejících s nadbytkem železa. Objasnění dosud nezodpovězených otázek v mechanismu poškození orgánů by mohlo být využito při vývoji vhodnějších chelátorů, které by sloužily k vychytávání redoxně aktivního železa v buňce a tím přispívaly ke snižování rizika oxidativního stresu. Dále může přispět k vývoji biochemických markerů, které by sloužily k ochraně a sledování efektivity terapeutických zásahů.

## 11. Seznam literatury

- ACEHAN, D.; JIANG, X.; MORGAN, D.G.; HEUSER, J.E.; WANG, X.; AKEY, C.W. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell.* 2002, vol.9, no.2, s.423-432.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science, Taylor&Francis Group, 2008. 1268 s. ISBN 978-0-8153-4106-2.
- ALLAMEH, A.; AMINI-HARANDI, A.; OSATI-ASHTIANI, F.; O'BRIEN, P.J. Iron overload induced apoptotic cell death in isolated rat hepatocytes mediated by reactive oxygen species. *Iranian J. Pharmaceutic. Res.* 2008, vol.7, no.2, s.115-121.
- ARVAPALLI, R.K.; PATURI, S.; LAURINO, J.P.; KATTA, A.; KAKARLA, S.K.; GADE, M.K.; WU, M.; RICE, K.M.; WALKER, E.M.; WEHNER, P.; BLOUGH, E.R. Deferasirox decreases age-associated iron accumulation in the aging F344XBN rat heart and liver. *Cardiovasc. Toxicol.* 2010, vol.10, no.2, s.108-116.
- BARTFAY, W.J.; BARTFAY, E. Iron-overload cardiomyopathy: evidence for a free radical--mediated mechanism of injury and dysfunction in murine model. *Biol. Res. Nurs.* 2000, vol.2, no.1, s.49-59.
- BARTFAY, W.J.; DAWOOD, F.; WEN, W.H.; LEHOTAY, D.C.; HOU, D.; BARTFAY, E.; LUO, X.; BACKX, P.H.; LIU, P.P. Cardiac function and cytotoxic aldehyde production in a murine model of chronic iron-overload. *Cardiovasc. Res.* 1999, vol.43, no.4, s.892-900.
- BEKRI, S.; GUAL, P.; ANTY, R.; LUCIANI, N.; DAHMAN, M.; RAMESH, B.; IANNELLI, A.; STACCINI-MYX, A.; CASANOVA, D.; BEN AMOR, I.; SAINT-PAUL, M.C.; HUET, P.M.; SADOUL, J.L.; GUGENHEIM, J.; SRAI, S.K.; TRAN, A.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology*. 2006, vol.131, no. 3, s.788-96.
- BISSONNETTE, R.P.; ECHEVERRI, F.; MAHBOUBI, A.; GREEN, D.R. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature*. 1992, vol.359, s.552-554.
- BOISE, L.H.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M.; POSTEMA, C.E.; LINDSTEN, T.; TURKA, L.A.; MAO, X.; NUÑEZ, G.; THOMPSON, C.B. *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, 1993, vol.74, no.4, s.597-608.
- BRESGEN, N.; JAKSCH, H.; LACHER, H.; OHLENSCHLÄGER, I.; UCHIDA, K.; ECKL, P.M. Iron-mediated oxidative stress plays an essential role in ferritin-induced cell death. *Free Radic. Biol. Med.* 2010, vol.48, no.10, s.1347-1357.
- CAIRO, G.; RECALCATI, S. Iron-regulatory proteins: molecular biology and pathophysiological implications. *Expert Rev. Mol. Med.* 2007, vol.9, issue 33, s.1-13. Review.
- CAMPANELLA, A.; ROVELLI, E.; SANTAMBROGIO, P.; COZZI, A.; TARONI, F.; LEVI, S. Mitochondrial ferritin limits oxidative damage regulating mitochondrial iron availability: hypothesis for a protective role in Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* 2009, vol.18, no.1, s.1-11.
- CARDIN, R.; D'ERRICO, A.; FIORENTINO, M.; CECCHETTO, A.; NACCARATO, R.; FARINATI, F. Hepatocyte proliferation and apoptosis in relation to oxidative damage in alcohol-related liver disease. *Alcohol Alcohol.* 2002, vol.37, no.1, s.43-48.

- CARLINI, R.G.; ALONZO, E.; BELLORIN-FONT, E.; WEISINGER, J.R. Apoptotic stress pathway activation mediated by iron on endothelial cells in vitro. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006, vol.21, no.11, s.3055-3061.
- CARRAWAY, M.S.; SULIMAN, H.B.; MADDEN, M.C.; PIANTADOSI, C.A.; GHIO, A.J. Metabolic capacity regulates iron homeostasis in endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2006, vol.41, no.11, s.1662-1669.
- COOKSEY, R.C.; JOUIHAN, H.A.; AJIOKA, R.S.; HAZEL, M.W.; JONES, D.L.; KUSHNER, J.P.; MCCLAIN, D.A. Oxidative stress,  $\beta$ -cell apoptosis, and decreased insulin secretory capacity in mouse models of hemochromatosis. *Endocrinology.* 2004, vol.145, no.11, s.5305-5312.
- COZZI, A.; ROVELLI, E.; FRIZZALE, G.; CAMPANELLA, A.; AMENDOLA, M.; AROSIO, P.; LEVI, S. Oxidative stress and cell death in cell expressing L-ferritin variants causing neuroferritinopathy. *Neurobiol. Dis.* 2010, vol.37, no.1, s.77-85.
- COZZI, A.; SANTAMBROGIO, P.; CORSI, B.; CAMPANELLA, A.; AROSIO, P.; LEVI, S. Characterization of the L-ferritin variant 460InsA responsible of a hereditary ferritinopathy disorder. *Neurobiol. Dis.* 2006, vol.23, no.3, s.644-652.
- CRICHTON, R.R.; WILMET, S.; LEGSSYER, R.; WARD, R.J. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J. Inorg. Biochem.* 2002, vol.91, no.1, s.9-18. Review.
- DEVI, S.L.; ANURADHA, C.V. Mitochondrial damage, cytotoxicity and apoptosis in iron-potentiated alcoholic liver fibrosis: amelioration by taurine. *Amino Acids.* 2010, vol.38, no.3, s.869-879.
- DONOVAN, A.; BROWNLIE, A.; ZHOU, Y.; SHEPARD, J.; PRATT, S.J.; MOYNIHAN, J.; PAW, B.H.; DREJER, A.; BARUT, B.; ZAPATA, A.; LAW, T.C.; BRUGNARA, C.; LUX, S.E.; PINKUS, G.S.; PINKUS, J.L.; KINGSLEY, P.D.; PALIS, J.; FLEMING, M.D.; ANDREWS, N.C.; ZON, L.I. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature.* 2000, vol.403, s.776-781.
- DONOVAN, A.; ROY, C.N.; ANDREWS, N.C. The ins and outs of iron homeostasis. *Physiology.* 2006, vol.21, s.115-123. Review.
- DU, C.; FANG, M.; LI, Y.; LI, L.; WANG, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000, vol.102, no.1, s.33-42.
- FARINATI, F.; CARDIN, R.; FIORENTINO, M.; D'ERRICO, A.; GRIGIONI, W.; CECCHETTO, A.; NACCARATO, R. Imbalance between cytoproliferation and apoptosis in hepatitis C virus related chronic liver disease. *J. Viral Hepat.* 2001, vol.8, no.1, s.34-40.
- FELDSTEIN, A.E.; CANBAY, A.; ANGULO, P.; TANIAI, M.; BURGART, L.J.; LINDOR, K.D.; GORES, G.J. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2003, vol.125, no.2, s.437-443.
- FUJITA, N.; MIYACHI, H.; TANAKA, H.; TAKEO, M.; NAKAGAWA, N.; KOBAYASHI, Y.; IWASA, M.; WATANABE, S.; TAKEI, Y. Iron overload is associated with hepatic oxidative damage to DNA in nonalcoholic steatohepatitis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2009, vol.18, no.2, s.424-432.
- GAO, X.; CAMPIAN, J.L.; QIAN, M.; SUN, X.F.; EATON, J.W. Mitochondrial DNA damage in iron overload. *J. Biol. Chem.* 2009, vol.284, no.8, s.4767-4775.

- GAO, X.; QIAN, M.; CAMPIAN, J.L.; MARSHALL, J.; ZHOU, Z.; ROBERTS, A.M.; KANG, Y.J.; PRABHU, S.D.; SUN, X.F.; EATON, J.W. Mitochondrial dysfunction may explain the cardiomyopathy of chronic iron overload. *Free Radic. Biol. Med.* 2010, vol.49, no.3, s.401-407.
- GHOSH, M.; CARLSSON, F.; LASKAR, A.; YUAN, X.M.; LI, W. Lysosomal membrane permeabilization causes oxidative stress and ferritin induction in macrophages. *FEBS Lett.* 2011, vol.585, no.4, s.623-629.
- GRASSMÉ, H.; SCHWARZ, H.; GULBINS, E. Molecular mechanisms of ceramide-mediated CD95 clustering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, vol.284, no.4, s.1016-1030.
- GREEN, D.; KROEMER, G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* 1998, vol.8, s.267-271.
- GULBINS, E.; DRESCHERS, S.; BOCK, J. Role of mitochondria in apoptosis. *Exp. Physiol.* 2003, vol.88, no.1, s.58-90. Review.
- GUNSHIN, H.; MACKENZIE, B.; BERGER, U.V.; GUNSHIN, Y.; ROMERO, M.F.; BORON, W.F.; NUSSBERGER, S.; GOLLAN, J.L.; HEDIGER, M.A. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 1997, vol.388, s.482-488.
- GUNSHIN, H.; STARR, C.N.; DiRENZO, C.; FLEMING, M.D.; JIN, J.; GREER, E.L.; SELLERS, V.M.; GALICA, S.M.; ANDREWS, N.C. Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. *Blood.* 2005, vol.106, no.8, s.2879-2883.
- HARRIS, L.R.; CAKE, M.H.; MACEY, D.J. Iron release from ferritin and its sensitivity to superoxide ions differs among vertebrates. *Biochem. J.* 1994, vol.301, s.385-389.
- HARRIS, Z.L.; DURLEY, A.P.; MAN, T.K.; GITLIN, J.D. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999, vol.96, s.10812-10817.
- HARRISON, P.M.; AROSIO, P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996, vol.1275, no.3, s.161-203. Review.
- HARRISON-FINDIK, D.D.; KLEIN, E.; CRIST, C.; EVANS, J.; TIMCHENKO, N.; GOLLAN, J. Iron-mediated regulation of liver hepcidin expression in rats and mice is abolished by alcohol. *Hepatology.* 2007, vol.46, no.6, s.1979-1985.
- HENTZE, M.W.; MUCKENTHALER, M.U.; ANDREWS, N.C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell.* 2004, vol.117, s.285-297. Review.
- HENTZE, M.W.; ROUAULT, T.A.; CAUGHMAN, S.W.; DANCIS, A.; HARFORD, J.B.; KLAUSNAER, R.D. A cis-acting element is necessary and sufficient for translational regulation of human ferritin expression in response to iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987, vol.84, no.19, s.6730-6734.
- HORÁK, J.; DOSTALÍKOVÁ, M.; HENDRICHOVÁ, M.; CHROBÁK, L.; KOVÁŘ, J.; KRAML, P.; KRÁTKÁ, K.; NEUBAUEROVÁ, J.; PŮTOVÁ, I.; STRÁNSKÝ, J.; STRÍTESKÝ, J. *Hemochromatóza*. Praha: Grada Publishing,a.s., 2010. 232 s. ISBN 978-80-247-3287-9.
- CHITTENDEN, T.; FLEMINGTON, C.; HOUGHTON, A.B.; EBB, R.G.; GALLO, G.J.; ELANGO VAN, B.; CHINNADURAI, G.; LUTZ, R.J. A conserved domain in Bak, distinct



- from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.* 1995, vol.14, issue 22, s.5589-5596.
- IMERYUZ, N.; TAHAN, V.; SONSUZ, A.; EREN, F.; URAZ, S.; YUKSEL, M.; AKPULAT, S.; OZCELIK, D.; HAKLAR, G.; CELIKEL, C.; AVSAR, E.; TOZUN, N. Iron preloading aggravates nutritional steatohepatitis in rats by increasing apoptotic cell death. *J. Hepatol.* 2007, vol.47, no.6, s.851-859.
- IWAI, K.; DRAKE, S.K.; WEHR, N.B.; WEISSMAN, A.M.; LAVAUTE, T.; MINATO, N.; KLAUSNER, R.D.; LEVINE, R.L.; ROUAULT, T.A. Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: Implications for degradation of oxidized proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998, vol.95, s.4924-4928.
- KATO, J.; KOBUNE, M.; KOHGO, Y.; SUGAWARA, N.; HISAI, H.; NAKAMURA, T.; SAKAMAKI, S.; SAWADA, N.; NIITSU, Y. Hepatic iron deprivation prevents spontaneous development of fulminant hepatitis and liver cancer in Long-Evans Cinnamon rats. *J. Clin. Invest.* 1996, vol.98, no.4, s.923-929.
- KISCHKE, F.C.; HELLBARDT, S.; BEHRMANN, I.; GERMER, M.; PAWLITA, M.; KRAMMER, P.H.; PETER, M.E. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 1995, vol.14, no.22, s.5579-5588.
- KIM, J.S.; HE, L.; LEMASTERS, J.J. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, vol.304, no.3, s.463-470.
- KOELLER, D.M.; CASEY J.L.; HENTZE, M.W.; GERHARDT, E.M.; CHAN, L.N.; KLAUSNER, R.D.; HARFORD, J.B. A cytosolic protein binds to structural elements within the iron regulatory region of the transferrin receptor mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989, vol.86, no.10, s.3574-3578.
- KOHGO, Y.; IKUTA, K.; OHTAKE, T.; TORIMOTO, Y.; KATO, J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int. J. Hematol.* 2008, vol.88, no.1, s.7-15.
- KULAKSIZ, H.; FEIN, E.; REDECKER, P.; STREMMEL, W.; ADLER, G.; CETIN, Y. Pancreatic  $\beta$ -cells express hepcidin, an iron-uptake regulatory peptide. *J. Endocrinol.* 2008, vol.197, no.2, s.241-249.
- KULAKSIZ, H.; THEILIG, F.; BACHMANN, S.; GEHRKE, S.G.; ROST, D.; JANETZKO, A.; CETIN, Y.; STREMMEL, W. The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J. Endocrinol.* 2005, vol.184, no.2, s.361-370.
- KURZ, T.; GUSTAFSSON, B.; BRUNK, U.T. Intralysosomal iron chelation protects against oxidative stress-induced cellular damage. *FEBS J.* 2006, vol.273, issue 13, s.3106-3117.
- KURZ, T.; TERMAN, A.; BRUNK, U.T. Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron. *Arch. Biochem. Biophys.* 2007, vol.462, issue 2, s.220-230.
- LAVRIK, I.N. Regulation of death receptor-induced apoptosis induced via CD95/Fas and other death receptors. *Mol. Biol.* 2011, vol.45, no.1, s.150-155. Review.

- LENZEN, S.; DRINKGERN, J.; TIEDGE, M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic. Biol. Med.* 1996, vol.20, no.3, s.463-466.
- LI, H.; ZHU, H.; XU, C.J.; YUAN, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998, vol.94, no.4, s.491-501.
- LI, L.Y.; LUO, X.; WANG, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 2001, vol.412, s.95-99.
- LIOCHEV, S.I.; FRIDOVICH, I. The role of  $O_2^{\cdot-}$  in the production of  $HO^{\cdot}$ : in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 1994, vol.16, no.1, s.29-33.
- LIU, X.; KIM C.N.; YANG, J.; JEMMERSON, R.; WANG, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome C. *Cell.* 1996, vol.86, no.1, s.147-157.
- LOU, L.X.; GENG, B.; CHEN, Y.; YU, F.; ZHAO, J.; TANG, C.S. Endoplasmatic reticulum stress involved in heart and liver injury in iron-loaded rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2009, vol.36, no.7, s.612-618.
- LU, Z.; NIE, G.; SOE-LIN, S.; TAO, Y.; CAO, Y.; ZHANG, Z.; LIU, N.; PONKA, P.; ZHAO, B. Overexpression of mitochondrial ferritin sensitizes cells to oxidative stress via an iron-mediated mechanism. *Antioxid. Redox Signal.* 2009, vol.11, no.8, s.1791-1803.
- MCCLAIN, D.A.; ABRAHAM, D.; ROGERS, J.; BRADY, R.; GAULT, P.; AJIOKA, R.; KUSHNER, J.P. High prevalence of abnormal glucose homeostasis secondary to decreased insulin secretion in individuals with hereditary haemochromatosis. *Diabetologia.* 2006, vol.49, no.7, s.1661-1669.
- MCKIE, A.T.; BARROW, D.; LATUNDE-DADA, G.O.; ROLFS, A.; SAGER, G.; MUDALY, E.; MUDALY, M.; RICHARDSON, C.; BARLOW D.; BOMFORD, A.; PETERS, T.J.; RAJA, K.B.; SHIRALI, S.; HEDIGER, M.A.; FARZANEH, F.; SIMPSON, R.J. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science.* 2001, vol.291, s.1755-1759.
- MCKIE, A.T.; MARCIANI, P.; ROLFS, A.; BRENNAN, K.; WEHR, K.; BARROW, D.; MIRET, S.; BOMFORD, A.; PETERS, T.J.; FARZANEH, F.; HEDIGER, M.A.; HENTZE, M.W.; SIMPSON R.J. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell.* 2000, vol.5, no.2, s.299-309.
- MERLE, U.; FEIN, E.; GEHRKE, S.G.; STREMMEL, W.; KULAKSIZ, H. The iron regulatory peptide hepcidin is expressed in the heart and regulated by hypoxia and inflammation. *Endocrinology.* 2007, vol.148, no.6, s.2663-2668.
- MESSER, J.G.; KILBARGER, A.K.; ERIKSON, K.M.; KIPP, D.E. Iron overload alters iron-regulatory genes and proteins, down-regulates osteoblastic phenotype, and is associated with apoptosis in fetal rat calvaria cultures. *Bone.* 2009, vol.45, no.5, s.972-979.
- MUZIO, M.; CHINNAIYAN, A.M.; KISCHKEL, F.C.; O'ROURKE, K.; SHEVCHENKO, A.; NI, J.; SCAFFIDI, C.; BRETZ, J.D.; ZHANG, M.; GENTZ, R.; MANN, M.; KRAMMER, P.H.; PETER, M.E.; DIXIT, V.M. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell.* 1996, vol.85, no.6, s.817-827.

- NAKAGAWA, T.; ZHU, H.; MORISHIMA, N.; LI, E.; XU, J.; YANKNER, B.A.; YUAN, J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ . *Nature*. 2000, vol.403, s.98-103.
- NARITA, M.; SHIMIZU, S.; ITO, T.; CHITTENDEN, T.; LUTZ, R.J.; MATSUDA, H.; TSUJIMOTO, Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998, vol.95, no.25, s.14681-14686.
- NEMETH, E.; TUTTLE, M.S.; POWELSON, J.; VAUGHN, M.B.; DONOVAN, A.; MCVEY WARD, D.; GANZ, T.; KAPLAN, J. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004, vol.306, s.2090-2093.
- NICOLAS, G.; BENNOUN, M.; DEVAUX, I.; BEAUMONT, C.; GRANDCHAMP, B.; KAHN, A.; VAULONT, S. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (*USF2*) knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001, vol.98, no.15, s.8780-8785.
- NIE, G.; SHEFTEL, A.D.; KIM, S.F.; PONKA, P. Overexpression of mitochondrial ferritin causes cytosolic iron depletion and changes cellular iron homeostasis. *Blood*. 2005, vol.105, no.5, s.2161-2167.
- NILSSON, E.; GHASSEMIFAR, R.; BRUNK, U.T. Lysosomal heterogeneity between and within cells with respect to resistance against oxidative stress. *Histochem. J.* 1997, vol.29, no.11-12, s.857-865.
- OHGAMI, R.S.; CAMPAGNA, D.R.; GREER, E.L.; ANTIOCHOS, B.; McDONALD, A.; CHEN, J.; SHARP, J.J.; FUJIWARA, Y.; BARKER, J.E.; FLEMING, M.D. Identification of a ferriredutase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat. Genet.* 2005, vol.37, no.11, s.1264-1269.
- OLTVAI, Z.N.; MILLIMAN, C.L.; KORSMEYER, S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993, vol.74, no.4, s.609-619.
- ORINO, K.; LEHMAN, L.; TSUJI, Y.; AYAKI, H.; TORTI, S.V.; TORTI, F.M. Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem. J.* 2001, vol.357, Pt.1, s.241-247.
- ODUIT, G.Y.; TRIVIERI, M.G.; KHAPER, N.; HUSAIN, T.; WILSON, G.J.; LIU, P.; SOLE, M.J.; BACKX, P.H. Taurine supplementation reduces oxidative stress and improves cardiovascular function in an iron-overload murine model. *Circulation*. 2004, vol.109, no.15, s.1877-1885.
- PARK, C.H.; VALORE, E.V.; WARING, A.J.; GANZ, T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.* 2001, vol.276, no.11, s.7806-7810.
- PEYSSONNAUX, C.; ZINKERNAGEL, A.S.; SCHUEPBACH, R.A.; RANKIN, E.; VAULONT, S., HAASE, V.H.; NIZET, V.; JOHNSON, R.S. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J. Clin. Invest.* 2007, vol.117, no.7, s.1926-1932.
- PIETRANGELO, A. Iron-induced oxidant stress in alcoholic liver fibrogenesis. *Alcohol*. 2003, vol.30, no.2, s.121-129.
- PIGEON, C.; ILYIN, G.; COURSELAUD, B.; LEROYER, P.; TURLIN, B.; BRISSOT, P.; LORÉAL, O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J. Biol. Chem.* 2001, vol.276, no.11, s.7811-7819.

- RAMEY, G.; FAYE, A.; DUREL, B.; VIOLLET, B.; VAULONT, S. Iron overload in Hepc1(-/-) mice is not impairing glucose homeostasis. *FEBS Lett.* 2007, vol.581, no.5, s.1053-1057.
- RAO, R.V.; HERMEL, E.; CASTRO-OBREGON, S.; DEL RIO, G.; ELLERBY, L.M.; ELLERBY, H.M.; BREDESEN, D.E. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J. Biol. Chem.* 2001, vol.276, issue 36, s.33869-33874.
- RAUEN, U.; PETRAT, F.; SUSTMANN, R.; DE GROOT, H. Iron-induced mitochondrial permeability transition in cultured hepatocytes. *J. Hepatol.* 2004, vol.40, no.4, s.607-615.
- RECALCATI, S.; ALBERGHINI, A.; CAMPANELLA, A.; GIANELLI, U.; DE CAMILLI, E.; CONTE, D.; CAIRO, G. Iron regulatory proteins 1 and 2 in human monocytes, macrophages and duodenum: expression and regulation in hereditary hemochromatosis and iron deficiency. *Haematologica.* 2006, vol.91, no.3, s.303-310.
- SALVADOR, G.A.; OTEIZA, P.I. Iron overload triggers redox-sensitive signals in human IMR-32 neuroblastoma cells. *Neurotoxicology.* 2011, vol.32, no.1, s.75-82.
- SHIMIZU, S.; NARITA, M.; TSUJIMOTO, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature.* 1999, vol.399, s.483-487.
- SUSIN, S.A.; LORENZO, H.K.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; BRENNER, C.; LAROCLETTE, N.; PRÉVOST, M.C.; ALZARI, P.M.; KROEMER, G. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J. Exp. Med.* 1999a, vol.189, no.2, s.381-294.
- SUSIN, S.A.; LORENZO, H.K.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; SNOW, B.E.; BROTHERS, G.M.; MANGION, J.; JACOTOT, E.; CONSTANTINI, P.; LOEFFLER, M.; LAROCLETTE, N.; GOODLETT, D.R.; AEBERSOLD, R.; SIDEROVSKI, D.P.; PENNINGER, J.M.; KROEMER, G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 1999b, vol.397, s.441-446.
- SUZUKI, Y.; IMAI, Y.; NAKAYAMA, H.; TAKAHASHI, K.; TAKIO, K.; TAKAHASHI, R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell.* 2001, vol.8, no.3, s.613-621.
- TAHA, R.; SEIDMAN, E.; MAILHOT, G.; BOUDREAU, F.; GENDRON, F.P.; BEAULIEU, J.F.; MÉNARD, D.; DELVIN, E.; AMRE, D.; LEVY, E. Oxidative stress and mitochondrial functions in the intestinal Caco-2/15 cell line. *PLoS One.* 2010, vol.5, no.7, e11817.
- TERMAN, A.; KURZ, T.; GUSTAFSSON, B.; BRUNK, U.T. The involvement of lysosomes in myocardial aging and disease. *Curr. Cardiol. Rev.* 2008, vol.4, no.2, s.107-115. Review.
- TUOI DO, T.H.; GABORIAU, F.; ROPERT, M.; MOIRAND, R.; CANNIE, I.; BRISSOT, P.; LORÉAL, O.; LESCOAT, G. Ethanol effect on cell proliferation in the human hepatoma HepaRG Cell line: relationship with iron metabolism. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2011, vol.35, no.3, s.408-419.
- TUROCZI, T.; JUN, L.; CORDIS, G.; MORRIS, J.E.; MAULIK, N.; STEVENS, R.G.; DAS, D.K. HFE mutation and dietary iron content interact to increase ischemia/reperfusion injury of the heart in mice. *Circ. Res.* 2003, vol.92, no.11, s.1240-1246.

- VECCHI, C.; MONTOSI, G.; ZHANG, K.; LAMBERTI, I.; DUNCAN, S.A.; KAUFMAN, R.J.; PIETRANGELLO, A. ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin. *Science*. 2009, vol.325, s.877-880.
- VULPE, C.D.; KUO, Y.M.; MURPHY, T.L.; COWLEY, L.; ASKWITH, C.; LIBINA, N.; GITSCHIER, J.; ANDERSON, G.J. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the *sla* mouse. *Nat. Genet.* 1999, vol.21, s.195-199.
- WANG, R.H.; LI, C.; XU, X.; ZHENG, Y.; XIAO, C.; ZERFAS, P.; COOPERMAN, S.; ECKHAUS, M.; ROUAULT, T.; MISHRA, L.; DENG, C.X. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab.* 2005, vol.2, s.399-409.
- WANG, Y.; WU, M.; AL-ROUSAN, R.; LIU, H.; FANNIN, J.; PATURI, S.; ARVAPALLI, R.K.; KATTA, A.; KAKARLA, S.K.; RICE, K.M.; TRIEST, W.E.; BLOUGH, E.R. Iron-induced cardiac damage: role of apoptosis and deferasirox intervention. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011, vol.336, no.1, s.56-63.
- WEIZER-STERN, O.; ADAMSKY, K.; MARGALIT, O.; ASHUR-FABIAN, O.; GIVOL, D.; AMARIGLIO, N.; RECHAVI, G. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism, is transcriptionally activated by p53. *Br. J. Haematol.* 2007, vol.138, no.2, s.253-262.
- YANG, J.L.; WEISSMAN, L.; BOHR, V.A.; MATTSON, M.P. Mitochondrial DNA damage and repair in neurodegenerative disorders. *DNA Repair*. 2008, vol.7, issue 7, s.1110-1120. Review.
- YANG, M.; CHAN, S.; CHEUNG, Y.F.; HA, S.Y.; CHAN, G.C. Iron-overload induces apoptosis in cardiomyocytes and hepatocytes via mitochondrial/caspase-3 pathways. *Blood. (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2008, vol.112, no.1, Abstract 1872.
- ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001, vol.2, no.1, s.67-71. Review.
- ZHANG, W.; YANG, M.; CHAN, S.; CHAN, G.C. TPO exerts a protective effect on iron-induced apoptosis via Erk1/2 signaling in human mesenchymal stem cells. *Blood. (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2008, vol.112, no.1, Abstract 1871.
- ZHAO, M.; ANTUNES, F.; EATON, J.W.; BRUNK, U.T. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 2003, vol.270, no.18, s.3778-3786.

## **12. Seznam obrázků**

<i>Obr. 1 Mechanismus transportu netransferinového železa u enterocyty .....</i>	<i>8</i>
<i>Obr. 2 Regulace metabolismu železa prostřednictvím IRP/IRE interakcí.....</i>	<i>9</i>
<i>Obr. 3 Regulace metabolismu železa prostřednictvím hepcidinu.....</i>	<i>11</i>
<i>Obr. 4 Schéma tvorby apoptosomu.....</i>	<i>15</i>
<i>Obr. 5 Schéma aktivace apoptózy vnější cestou, vnitřní cestou a ER stresem .....</i>	<i>16</i>
<i>Obr. 6 Vliv vysokých hladin železa a alkoholu na jaterní poškození.....</i>	<i>20</i>